

## ФАРМАКОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Рекомендована д. біол. наук, проф. Л. С. Фірою

УДК 541.49; 615.015:615.05; 616.24; 616-0.01.17.0.01.08

### ВПЛИВ ІНФУЗІЙНИХ РОЗЧИНІВ ЛАКТОПРОТЕЇНУ З СОРБІТОЛОМ ТА НАЕС-LX-5 % НА БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ ФІБРОГЕНЕЗУ ЛЕГЕНЕВОЇ ТКАНИНИ В ЩУРІВ З ОПІКОВОЮ ТРАВМОЮ ШКІРИ

©А. О. Очеретнюк

Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова

**Резюме:** в роботі показано, що за умов опікової хвороби, особливо на 3-тю добу, проходить ремоделювання сполучної тканини та активуються процеси окисного пошкодження фосфоліпідного бішару легень. Введення колоїдно-гіперосмолярного розчину НАЕС-LX-5 % та розчину лактопротеїну з сорбітолом щурам з опіковою травмою шкіри чинить антифіброгенну дію, а також зменшує виразність окисної деградації мембранних фосфоліпідів, при чому їх протекторна дія найбільш виразна на 7-му добу експерименту.

**Ключові слова:** інфузійна терапія, фіброгенез, фосфоліпіди, НАЕС-LX-5 %, лактопротеїн із сорбітолом.

**Вступ.** Опікова травма шкіри є важливою проблемою сьогодення через велику розповсюдженість, високу летальність, складність патогенезу та лікування [1]. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, термічні ураження займають третє місце в загальній структурі травматизму. Щорічно в розвинених країнах реєструють 290–300 опіків на 100 тис. населення. Загальна летальність від опіків у світі коливається в межах 0,6–5 % [2].

Тригерними механізмами альтерації легеневої тканини за умов опікової травми шкіри є розвиток оксидативного стресу, який супроводжується накопиченням продуктів окисної модифікації ліпідів та руйнуванням клітинних мембран [3, 4]. Поряд з цим реєструють ремоделювання сполучної тканини, активуються процеси фіброгенезу в тканинах легень. Цілком очевидно, що ефективність потенційних коректорів функціонального стану легень значною мірою визначається їх здатністю стримувати накопичення реакційноздатних вільних радикалів, зменшувати ураження біліпідного шару клітинних мембран, а також виявляти депримуєчий вплив щодо процесів фіброгенезу в тканині легень.

**Метою дослідження** було оцінити вплив інфузійних розчинів НАЕС-LX-5 % та лактопротеїну з сорбітолом (референс-препарат) на маркери фіброгенезу, деструкції сполучної тканини та фосфоліпідний спектр клітин легень у щурів з опіковою травмою шкіри.

**Методи дослідження.** Експериментальні дослідження виконано на 32 білих нелінійних щурах-самцях масою 160–180 г, які було отримано із віварію Інституту фармакології та токсикології АМН України. Дослідження проводили в лабораторії кафедри фармакології ВНМУ, сертифікованої ДФЦ МОЗУ (посвідчення № 000679 від 11.01.2008 р.). Тварини розподілили на групи по 8 щурів у кожній: 1-ша група –

щурі, яким проводили катетеризацію стегнової вени без опіку (тварини без опіку); 2-га – щури з опіком та встановленим катетером у стегновій вені, яким проводили внутрішньовенну інфузію 0,9 % розчином NaCl протягом 5-6 хв у дозі 10 мл/кг. Опіковий шок викликали шляхом прикладання 4-х мідних пластинок (по дві пластинки з кожного боку), які попередньо тримали протягом 6 хв у воді з постійною температурою 100 °С. Загальна площа опіку у щурів зазначеної маси складає 21–23 % при експозиції 10 с, що є достатнім для формування опіку III ступеня та розвитку шокового стану середнього ступеня тяжкості [5]; 3-тя – щури з опіком та встановленим катетером у стегновій вені, яким проводили внутрішньовенну інфузію розчином лактопротеїну з сорбітолом протягом 5–6 в у дозі 10 л/кг/добу або IV – розчином НАЕС-LX-5 % у тій же дозі у нижню порожнисту вену. Введення інфузійних розчинів здійснювали через 1 год після моделювання патологічного стану, а потім 1 раз на добу протягом 7 іб. Катетеризацію магістральних судин здійснювали в умовах пропофолового наркозу (60 мг/кг в/в). Тварин виводили із досліду (на 1-шу, 3-тю та 7-му доби експерименту) шляхом декапітації в результаті передозування ефіру.

Біохімічні дослідження виконано в науково-дослідній клініко-діагностичній лабораторії ВНМУ імені М. І. Пирогова, сертифікованої МОЗ України (свідоцтво про переатестацію № 002/10 від 11 січня 2010 р.). Сироватку крові виділяли за стандартною методикою [6]. Гомогенати легень отримували після відокремлення крупних бронхів та трахеї, тканини гомогенізували в скляному гомогенізаторі з тефлоновим пестиком при 3000 об/хв 5 хвилин в 0,154 М розчині хлориду калію у ваговому співвідношенні 1:3, центрифугували при 600 г протягом 30 хвилин, супернатант використовували для біохімічних досліджень.

У сироватці крові визначали вміст маркерів де-струкції сполучної тканини та фіброгенезу (вільного оксипроліну, трансформуючого фактора росту –  $\beta 1$ ). В гомогенаті легень визначали вміст фосфатидилхоліну та лізофосфатидилхоліну.

Вміст трансформуючого фактора росту –  $\beta 1$  (ТФР- $\beta 1$ ) визначали за набором «TGF- $\beta 1$ » (Biosource, Eugene S.A.), рівень вільного оксипроліну – за реакцією з пара-диметиламінобензальдегідом [7].

Фосфоліпідний спектр визначали методом тонкошарової хроматографії на силікагелі Л5/40 (Сhemarol, Чехія). Фракції фосфоліпідів розділяли в системі хлороформ-метанол-вода у співвідношенні 65:30:5 (за об'ємом). Ідентифікацію окремих фосфоліпідів (фосфатидилхоліну, лізофосфатидилхоліну) проводили методом свідків після їх хроматографічного розділення [8]. Кількісне визначення фракцій фосфоліпідів після хроматографії проводили за реакцією з фосфорнованіліновим реактивом.

**Результати й обговорення.** Опікова травма шкіри супроводжувалась зміною фосфоліпідного спектра клітинних мембран легеневої тканини, порушення мембранної проникності та транспорту речовин (табл. 1). Встановлено, що в легенях щурів зменшувався вміст фосфатидилхоліну (на 35,4 % – на 1-шу добу; на 46,9 % – на 3-тю добу; на 40,1 % – на 7-му добу) на тлі зростання рівня його окисненої форми – лізофосфатидилхоліну (на 33,8 % – на 1-шу добу; на 65,5 % – на 3-тю добу; на 50,8 % – на 7-му добу), відносно інтактних щурів. За цих умов спостерігали

падіння співвідношення рівнів фосфатидилхоліну до лізофосфатидилхоліну (на 51,9 % – на 1-шу добу; на 68,0 % – на 3-тю добу; на 60,4 % – на 7-му добу), порівняно з таким у групі тварин без опікової хвороби шкіри.

Інфузійна терапія розчинами досліджуваних речовин зменшувала дисбаланс між окремими фосфоліпідами, індукований опіковою травмою шкіри (табл. 1). Так, застосування розчинів НАЕС-LX-5 % та лактопротеїну з сорбітолом протягом 1-ї доби не справляло достовірного впливу на вказані показники, тоді як з 3-ї доби супроводжувалось, відповідно, зростанням вмісту фосфатидилхоліну (відповідно на 16,2 та 14,1 %), зменшенням рівня лізофосфатидилхоліну (відповідно на 17,0 та 15,1 %) та збільшенням співвідношення цих фосфоліпідів (відповідно на 40,6 та 35,5 %), порівняно з контролем. Введення вказаних препаратів протягом 7-ми діб мало найбільший коригуючий вплив щодо порушень фосфоліпідного спектра: зростання вмісту фосфатидилхоліну становило відповідно 23,1 та 18,7 %, зменшення рівня лізофосфатидилхоліну – відповідно 21,2 та 19,9 %, а збільшення співвідношення вказаних фосфоліпідів – відповідно 61,4 та 52,1 %, відносно таких показників у контрольній групі тварин.

Аналіз маркерів ремоделювання сполучної тканини та фіброгенезу показав, що опікова травма шкіри спричиняла істотні зміни в складі легневих біополімерів (табл. 2). В сироватці крові спостерігали статистично вірогідне зростання вмісту вільного оксипроліну (на 59,5 % – на 1-шу добу; на 97,4 % – на

**Таблиця 1.** Вміст фосфатидилхоліну, лізофосфатидилхоліну та їх співвідношення в постядерному супернатанті гомогенату легень у щурів з опіковою травмою шкіри і на тлі фармакотерапії ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )

Характеристика груп тварин		ФХ, мкмоль/г сухої тка- нини	ЛФХ, мкмоль/г сухої тка- нини	ФХ/ЛФХ
Інтактні тварини (без опікової травми шкіри)		17,9 $\pm$ 0,44	0,813 $\pm$ 0,021	22,1 $\pm$ 0,80
Опікова травма+0,9 % NaCl (контроль)	1-ша доба	11,5 $\pm$ 0,42*	1,09 $\pm$ 0,02*	10,6 $\pm$ 0,37*
	3-тя доба	9,49 $\pm$ 0,32*°	1,35 $\pm$ 0,03*°	7,06 $\pm$ 0,22*°
	7-ма доба	10,7 $\pm$ 0,36*&	1,20 $\pm$ 0,03*&	8,70 $\pm$ 0,24*&
Опікова травма+ НАЕС- LX-5 %	1-ша доба	12,1 $\pm$ 0,60*	0,960 $\pm$ 0,020*	12,6 $\pm$ 0,59*#
	3-тя доба	11,0 $\pm$ 0,42*#	1,10 $\pm$ 0,04*#°	9,90 $\pm$ 0,35*#°
	7-ма доба	13,2 $\pm$ 0,56*#&	0,970 $\pm$ 0,060*#&	14,1 $\pm$ 1,20*#&
Опікова травма+ лактопротеїн з сорбітолом	1-ша доба	12,1 $\pm$ 0,49*	0,970 $\pm$ 0,030*	12,6 $\pm$ 0,70*
	3-тя доба	10,8 $\pm$ 0,34*#°	1,14 $\pm$ 0,050*#°	9,60 $\pm$ 0,44*#°
	7-ма доба	12,7 $\pm$ 0,66*#&	0,980 $\pm$ 0,060*#&	13,3 $\pm$ 1,14*#&

Примітки: 1) \* –  $p < 0,05$  відносно показників в інтактних тварин;

2) # –  $p < 0,05$  відносно показників у контрольній групі;

3) ° –  $p < 0,05$  між показниками на 1-шу та 3-тю доби експерименту в межах однієї групи;

4) ° –  $p < 0,05$  між показниками на 3-тю та 7-му доби експерименту в межах однієї групи.

5) ФХ – фосфатидилхолін;

6) ЛФХ – лізофосфатидилхолін.

**Таблиця 2.** Вміст маркерів деструкції сполучної тканини та фіброгенезу в сироватці крові щурів з опіковою травмою шкіри і на тлі фармакотерапії ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )

Характеристика груп тварин		Вільний оксипролін, мкмоль/л	ТФР- $\beta 1$ , пг/мл
Інтактні тварини (без опікової травми шкіри)		25,2 $\pm$ 2,42	121 $\pm$ 4,82
Опікова травма+0,9 % NaCl (контроль)	1-ша доба	40,2 $\pm$ 1,06*	191 $\pm$ 11,5*
	3-тя доба	49,8 $\pm$ 1,49*°	287 $\pm$ 9,64*°
	7-ма доба	42,9 $\pm$ 1,74*&	261 $\pm$ 6,24*&
Опікова травма+ HAES- LX-5 %	1-ша доба	37,0 $\pm$ 2,04*	165 $\pm$ 9,15*
	3-тя доба	41,8 $\pm$ 2,38*#	220 $\pm$ 5,62*#°
	7-ма доба	32,3 $\pm$ 1,35*#&	169 $\pm$ 9,10*#&
Опікова травма+ лактопротеїн із сорбітолом	1-ша доба	36,4 $\pm$ 2,04*	167 $\pm$ 3,82*
	3-тя доба	42,9 $\pm$ 2,18*#°	231 $\pm$ 2,49*#°
	7-ма доба	33,7 $\pm$ 1,16*#&	172 $\pm$ 7,12*#&

Примітки: 1) \* –  $p < 0,05$  відносно показників в інтактних тварин;  
 2) # –  $p < 0,05$  відносно показників у контрольній групі;  
 3) ° –  $p < 0,05$  між показниками на 1-шу та 3-тю доби експерименту в межах однієї групи;  
 4) ° –  $p < 0,05$  між показниками на 3-тю та 7-му доби експерименту в межах однієї групи.

3-тю добу; на 70,0 % – на 7-му добу) та трансформуючого фактора росту ТФР- $\beta 1$  (на 57,8 % – на 1-шу добу; на 137 % – на 3 добу; на 116 % – на 7-му добу) відносно інтактної групи тварин.

Фармакотерапія опікової травми шкіри розчинами HAES-LX-5 % та лактопротеїну з сорбітолом до певної міри попереджало ремоделювання сполучної тканини та фіброгенез (табл. 2). Зокрема, станом на 3-тю добу введення досліджуваних препаратів супроводжувалося зменшенням в сироватці крові вмісту вільного оксипроліну (відповідно на 16,2 та 13,9 %) та трансформуючого фактора росту ТФР- $\beta 1$  (відповідно на 23,5 та 19,3 %), порівняно з контролем. На 7-му добу експерименту антифіброгенна активність розчинів HAES-LX-5 % та лактопротеїну з сорбітолом була найбільшою: зменшення вмісту в сироватці крові вільного оксипроліну становило відповідно 24,7 та 21,4 %, а трансформуючого фактора росту ТФР- $\beta 1$  – відповідно 35,2 та 34,0 % порівняно з контрольною групою тварин.

Таким чином, опікова травма шкіри викликає різноманітні біохімічні та патофізіологічні зрушення в організмі щурів в цілому та легеневій тканині зокрема. Наші дослідження показали, що опікова хвороба супроводжується порушенням фосфоліпідного спектра тканин легень, що проявлялось зменшенням вмісту фосфатидилхоліну та зростанням продукту його окиснення – лізофосфатидилхоліну. Ковалентна модифікація фосфоліпідів мембран за опікової хвороби призводить до порушення проникності клітинних мембран та розладів у роботі клітинних насосів, які необхідні для транспорту речовин та створення градієнту кон-

центрації йонів по обидві сторони від мембрани клітин. Поряд з вказаними змінами за опікової хвороби проходить ремоделювання сполучної тканини та активуються процеси фіброгенезу, про що доказово свідчило зростання в сироватці крові вільного оксипроліну та трансформуючого фактора росту ТФР- $\beta 1$ .

Фармакологічна корекція опікової хвороби за допомогою розчинів HAES-LX-5 % та лактопротеїну з сорбітолом певною мірою нормалізувало співвідношення фосфатидилхоліну / лізофосфатидилхоліну в клітинних мембранах легеневої тканини та запобігало ремоделюванню сполучної тканини та активації фіброгенезу. За вказаними ефектами HAES-LX-5 % не поступався референс-препарату – лактопротеїну з сорбітолом.

**Висновки.** 1. Опікова травма шкіри в щурів супроводжується розвитком дисбалансу фосфоліпідів легень (вміст фосфатидилхоліну зменшується на 35–47 %, а рівень лізофосфатидилхоліну зростає на 34–66 %), зростанням вмісту в сироватці крові маркерів деструкції сполучної тканини (вільного оксипроліну – на 60–97 %) та фіброгенезу (ТФР- $\beta 1$  – на 58–137 %).

2. Застосування колоїдно-осмотичного розчину HAES-LX-5 % та лактопротеїну з сорбітолом стимулювало розвиток ремоделювання сполучної тканини, процеси фіброгенезу та окисного пошкодження фосфоліпідного бішару легень.

Подальші дослідження в цьому напрямку дозволять поглибити існуючі уявлення щодо механізмів пульмопротекторної дії розчинів HAES-LX-5 % за умов опікової хвороби.

## Література

1. Козинець Г. П. Опікова хвороба / Г. П. Козинець, О. Н. Коваленко, С. В. Слесаренко // Журн. сучасного лікаря. Мистецтво лікування. – 2006. – № 12. – С. 9–12.
2. Disturbances of electrolytes in severe thermal burns / M. L. Hauhouot Attoungbre, W. C. Mian, N. A. Edjeme [et al.] // Ann. Biol. Clin. (Paris). – 2005. – Vol. 63, № 4. – P. 417–421.
3. Придруга С. М. Патогенетичні механізми пошкодження органів у різні періоди травматичної хвороби / С. М. Придруга, Н. В. Гасюк // Світ медицини та біології. – 2012. – № 2 (8). – С. 194–200
4. Сухомлин Т. А. Процеси перекисного окиснення ліпідів у легенях щурів за умов опікової хвороби та їх корекція препаратом «Ліпін» / Т. А. Сухомлин // Актуальні проблеми сучасної медицини: вісник української медичної стоматологічної академії. – 2013. – № 4 (44). – С. 187–190.
5. Gunas I. Method of thermal burn trauma correction by means of cryoinfluence / I. Gunas, I. Dovgan, O. Masur // Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft. 92. In Olsztyn vom 24. Bis 27. Mai 1997: bipartitemeeting / zusammen mit der Polish Anatomical Society with the participation of the Association des Anatomistes. – 1997. – P. 105.
6. Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / под ред. В. В. Меньшикова. – М. : Медицина, 1987. – 368 с.
7. Определение свободного и пептидно-связанного гидроксипролина в сыворотке крови / П. Н. Шараев, Е. П. Сахабутдинова, О. И. Лекомцева, С. В. Кошикова // Клин. лабор. диагностика. – 2009. – № 1. – С. 7–9.
8. Кейтс М. Техника липидологии / М. Кейтс. – М. : Мир, 1975. – 126–135 с.

## ВЛИЯНИЕ ИНФУЗИОННЫХ РАСТВОРОВ ЛАКТОПРОТЕИН С СОРБИТОЛОМ И HAES-LX-5 % НА БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ФИБРОГЕНЕЗА ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ У КРЫС С ОЖГОВОЙ ТРАВМОЙ КОЖИ

А. А. Очеретнюк

*Винницкий национальный медицинский университет имени Н. И. Пирогова*

**Резюме:** в работе показано, что при ожоговой болезни, особенно на 3 сутки, происходит ремоделирование соединительной ткани и активируются процессы окислительного повреждения фосфолипидного бислоя легких. Введение крысам с ожоговой травмой кожи коллоидно-гиперосмолярного раствора – HAES-LX-5 % и раствора лактопротеина с сорбитолом оказывает антифиброгенное действие, а также уменьшают выраженность окислительной дегградации мембранных фосфолипидов, причем их протекторное действие максимально на 7 сутки эксперимента.

**Ключевые слова:** инфузионная терапия, фиброгенез, фосфолипиды, HAES-LX -5 %, лактопротеин с сорбитолом.

## INFLUENCE OF LACTOPROTEINUM WITH SORBITOL AND HAES-LX-5 % INFUSION'S SOLUTIONS ON BIOCHEMICAL MARKERS OF FIBROGENESIS LUNG TISSUE IN RATS WITH SKIN BURN TRAUMA

А. О. Ocheretnyuk

*Vinnitsia National Medical University by M. I. Pyrohov*

**Summary:** it is shown that in a case of burn disease, especially on the third day, remodeling of connective tissue and oxidative damage phospholipid lungs takes place. Infusion of colloidal hyperosmolar solution – HAES-LX- 5 % and lactoproteinum solution with sorbitol equally causes antifibrogenic effect and reduces the severity of oxidative degradation of membrane phospholipids in rats with skin burns. Their protective effect is the most expressive on the seventh day of the experiment.

**Key words:** infusion therapy, fibrogenesis, phospholipids, HAES-LX-5 %, lactoproteinum with sorbitol.

Отримано 03.04.2015